

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年2月5日 (05.02.2004)

PCT

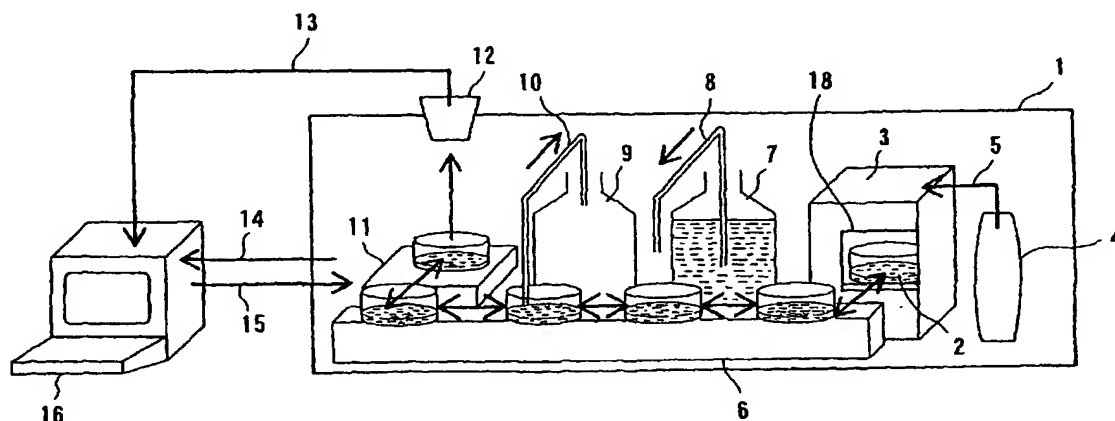
(10) 国際公開番号  
WO 2004/011593 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12M 3/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009742
- (22) 国際出願日: 2003年7月31日 (31.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-223892 2002年7月31日 (31.07.2002) JP  
特願2003-64155 2003年3月10日 (10.03.2003) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてののみ): 高木 睦 (TAK-AGI, Mutsumi) [JP/JP]; 〒567-0046 大阪府 茨木市 南春日丘5-1-5 5-2 1 1 Osaka (JP). 吉田 敏臣 (YOSHIDA, Toshiomi) [JP/JP]; 〒565-0824 大阪府 吹田市 山田西2-4-A 1-5 0 5 Osaka (JP). 脇谷 滋之 (WAKITANI, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒390-0304 長野県 松本市 大村3 7 9-1-1 0 1 Nagano (JP).
- (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都 渋谷区 宇田川町3 7-1 0 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,

[続葉有]

(54) Title: AUTOMATIC CULTURE APPARATUS FOR CELL OR TISSE WITH BIOLOGICAL ORIGIN

(54) 発明の名称: 生体由来の細胞または組織の自動培養装置



(57) Abstract: An automatic culture apparatus for culturing cells or a tissue with a biological origin in a culture container which is placed in a box-type culture apparatus having a closed and aseptic inner space, characterized in that a plural number of divided spaces, a gas incubator provided with a practicable window, a unit for supplying a liquid culture medium and a unit for discharging the same, a unit for monitoring the culture conditions, and a transferring unit for continuously or intermittently transferring the culture container toward these units are provided in the box of the culture apparatus, and at least one of the above-described units is equipped with an instruction controlling unit by which the culture apparatus is controlled under an instruction in the form of an electrical signal depending on a data signal generated by the culture condition-monitoring unit so as to prevent cross-contamination.

(57) 要約: 閉鎖され、かつ、無菌状態の内部空間を有する箱体の培養装置内で、培養容器において生体由来の細胞または組織を培養する自動培養装置であって、培養装置の箱体内に複数に区分けされた空間、開閉窓付きガスインキュベーター、培養液の供給装置と排出装置、培養状態の観察装置並びにこれら装置に培養容器を連続的もしくは断続的に移動させる移動装置が配置されているとともに、培養状態の観察装置からのデータ信号によって、前記の装置の少なくともいずれかのものの動作を電気信号により指示制御する指示制御装置が具備され、交叉汚染を防止することができることを特徴とする。



NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### 生体由来の細胞または組織の自動培養装置

5

#### 技術分野

この出願の発明は、細胞または組織の自動培養装置に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、再生医療等を目的とする細胞または組織の培養操作および培養環境の制御が自動化された培養装置に関するものである。

- 10     またこの出願の発明は、細胞または組織に対して非侵襲性の測定装置を具備した自動培養装置に関するものである。

#### 背景技術

- 近年、生体細胞や生体組織を体外で培養して得られた細胞や組織を体内あるいは体表面の欠陥や欠損もしくは不完全部位の修復に用いるという再生医療が、多くの基礎研究の蓄積と展開によりその実現性が高まり、社会的にも大きく期待されている。実際、これまでの研究で、皮膚、軟骨、骨、血管、肝細胞、膵臓等の多くの組織が再生医療の対象と成り得ることが報告されている。このような再生医療のための細胞または組織の起源としては、皮膚や軟骨等の分化した組織あるいはその組織中の細胞、骨髓液中等に存在すると言われている造血幹細胞、間葉系幹細胞や肝臓中に存在する肝幹細胞等の体性幹細胞、さらには受精卵の内部細胞塊に由来し、体内のほとんどの組織の細胞に分化する能力を有する胚性幹細胞（ES細胞）等がある。

- 25     いずれの起源の細胞にせよ、生体から得られる細胞数には限りがあるため、これらを再生医療に用いる場合には一般に体外で培養、増殖、分化させる必要がある。このため、たとえば、表皮細胞に由来する皮膚、軟骨細胞に由来する軟骨等の場合にはそれらの分化状態を維持したまま増殖させることが、また、体性幹細胞や胚性幹細胞を用いる場合には、幹細胞を増殖させた後に治療部位に応じた細

胞へと分化させる必要があると考えられている。さらにまた、幹細胞を増殖させて細胞数を増やして生体に移植させ、生体内で分化や組織形成を行う方法も考えられている。

- 5 一方、生体の細胞や組織の由来には、本人自身の細胞や組織を用いる場合と、本人以外のヒト由来の細胞や組織を用いる場合とがある。前者の場合、移植の際における拒絶反応の可能性が低いという利点がある反面、移植を受ける患者ごとに材料となる細胞や組織を準備する必要がある。後者の場合は、同じ個体由来の細胞や組織を用いて多くの患者の再生医療を行える可能性があるが、患者によつて必要とする再生組織の形や大きさが異なる等の医療内容が異なるため、患者ごとに異なるロットでの細胞または組織の培養が必要となる。さらに、再生医療を目的とした細胞または組織の培養は、その培養スケールは非常に小さいという特徴を有している。たとえば、骨髓液 10ml に含まれる間葉系幹細胞を増殖させた後、軟骨細胞に分化させ、軟骨の再生医療に用いる場合の培養スケールは 100ml
- 10 以下と考えられている。すなわち、再生医療を目的とした細胞または組織の培養には、「小スケール、多ロット並行培養」が求められている。

- また、細胞または組織の培養の際には、ウイルスや細菌、種々の化学物質等による汚染を防止するための注意および対策を厳格に講じる必要がある。移植等の再生医療を目的とする場合は、ウイルスや細菌、種々の化学物質等が混入し、汚染が発生した場合、培養中の細胞や組織がガン化する等、その性質が著しく変化
- 20 する可能性があり、この性質が変化した細胞や組織を生体に移植する事は、ガンの発生誘発等の新たな疾患、また汚染の原因となったウイルスや細菌等が新たな病因となる可能性を有するため、厳重に汚染の防止を実践しなければならない。そのため、細胞または組織の培養には、厳重な管理体制を有する施設内で行い、
- 25 高度な無菌操作等の培養操作基準を設ける必要がある。たとえば、産業技術総合研究所では、クラス 1000 のクリーンルーム内で、作業者が無人衣を着用し、クラス 100 のクリーンベンチを用いて高度な無菌操作によって、培養を実施している。

また、米国食品医薬品局（FDA）において指摘されているように（ヒト体細胞を用いた細胞治療用の医薬製品の製造および品質管理上考慮すべき点）、生体細胞や組織の内、患者自身の細胞や組織（自家細胞）には、患者によって必要となる再生組織の大きさや形状が異なり、また患者固有に保有している感染源を他の患者由来の細胞や組織培養に混入することは、絶対に避けなければならない。

そして、再生医療を目的とする細胞または組織の培養には、長い期間を要する。一般に哺乳類等の動物由来の培養細胞は、生体外における増殖速度は遅く、細胞数の倍化にかかる時間は2～3日要する。一方、細菌等の雑菌の増殖速度は速く、その倍化時間は20分～1時間ほどであるため、わずか1個でも細菌等の雑菌が混入した場合、培養中の細胞または組織の増殖よりも、細菌等の雑菌の方が大量に増殖してしまい、培養中の細胞または組織は全くの使い物にならなくなる。

以上のような問題を解決するため、多くの改善策が構想され、試行されてきたが、次のような問題点が依然と残されていた：

- (1) 手作業のため、汚染の可能性がわずかでも存在する；
- (2) 作業者自身がウイルスやマイコプラズマ、細菌等の感染源となる可能性がある；
- (3) 厳重な管理の下にあるような条件や環境等が整備された特殊な培養施設が必要である；
- (4) 作業効率が低いこと；
- (5) 作業には高度な熟練性を要するため、作業者が限られ、人件費が高くなる；および
- (6) 自家細胞の場合、複数の細胞種が同時に同じ施設内で操作されるため、相互混入される可能性がある；

そこで、これら問題点を解決するために、環境条件を任意に制御できる培養チャンバとこれに培養液貯留容器と廃培養液貯留器が配管により接続された装置（特開 2001-238663）や Automation Partnership 社（米国）の「Cell mate」、同社の「Select T」等が開発されてきている。しかしながら、これらいずれのものも、

再生医療を目的とした細胞や組織の培養で要求される特徴である「小スケール、多ロット並行培養」という特徴を有していない、専用の培養容器を必要としており、一台の培養装置だけでは同時に複数の培養の実施ができず、長期間の培養時  
5 における定期的洗浄等のメンテナンスへの対応や培養中に任意に培養条件の変更ができない等の問題がある。

さらに、動物細胞は、そのほとんどは何かの基質に物理的に接着していないと生存できない接着依存性を有している。そのため、一般にはプラスチック製の培養容器底面に細胞を接着させて、培養している。増殖や分化させた細胞を生体  
10 に移植する等をして、再生医療に利用するように培養後の細胞を用いる際には、培養容器に接着したままで使用するような一部の場合を除き、細胞を培養容器から剥離させ、浮遊状態にする必要がある。従来は、このような細胞の脱着、剥離のために、トリプシンやコラーゲナーゼ等の蛋白質分解酵素を用いている。しか  
しながら、酵素処理だけでは完全に細胞を剥離することは難しく、また細胞が培  
15 養容器表面から剥離しても、細胞の凝集塊が残ることが多い。そこでこのよう場合には、通常、ピペットを用いて、培養液あるいは洗浄液を培養容器の細胞接着面に噴出させて剥離あるいは、細胞塊の解離させる操作を繰り返す、ピペッティ  
ング操作を行うことになる。このピペッティング操作は、培養操作において重要  
20 であるが、噴出させる速度の調整や噴出方向と培養容器内の細胞接着面との角度の調節等、その操作には熟練を要することから、作業者を限定されたものとなっていた。また、培養液等を無菌的に培養容器内に注入する方法としては、たとえば、以下のような方法があった：

(1) 培養液容器にセットされたチューブをチュービングポンプで吸い上げて、培養液を培養容器へ注入する方法：および

25 (2) 培養液容器内へピペット等の器具を挿入し、培養液を採取し、この培養液を培養容器へ注入する方法；

しかしながら、このような注入方法では、培養液を培養容器内へ注入する際にチューブやピペット等の先端に培養物が付着し、別の培養容器へ混入する可能性や

ピペット等の器具に培養液を採取するためのガスを介した相互混入の可能性もあった。しかも、この培養物が異なる細胞種であったり、培養物に細菌や病原体が付帯していたりした場合、その影響は問題となる可能性があった。再生医療を  
5 目的とした培養において、多ロット並行培養が有用であるため、その影響は特に大きかった。

細胞培養においても、機能や活性が高い細胞を得るために生体内で各組織および各細胞が置かれている生理的な環境を模倣した培養環境の制御は重要であるが、この生体内における環境因子には、張力、筋断力、静圧力、圧迫力等の物理  
10 的な力がある。たとえば、血管内皮細胞は血流による筋断力により細胞形態が変化し、またサイトカイン産生量が増減することが知られている。従来では張力、筋断力および静圧力に関する培養環境の制御法や装置についての報告は多いが、圧迫力を制御する装置の例はない。

一方、このような培養工程において、培養物の培養経過の分析・測定も重要である。特に、(1) 培養中の細胞や組織の「量」および(2) 培養中の細胞や組織の「質」の分析・測定は、培養の継続、もしくは中止、培養条件の変更等に重要である。たとえば、細胞や組織の量的な変化を経時的に測定することによって、適切な培養操作(培養の継続や培養の完了の判断等)がスムーズに行うことができるし、また、培養している細胞の代謝活性や生死、分化状態等の質的情報の分  
20 析や測定によって、細胞の状態が正確に把握することもできる。しかしながら、従来のこのような測定手段としては、培養容器中の細胞や組織の一方向(主に培養容器上方から)から光学顕微鏡等による観察、画像解析が一般的であり、このような測定手段では、一方向から得た情報(平面的な情報)、すなわち、細胞が接着している面積の総和(細胞接着面)に対する情報しか得ることができない。  
25 さらに、細胞には接着面に対しての厚みが多種多様であり、光学顕微鏡観察像の画像解析からだけでは、培養中の細胞や組織の量的測定が困難である。

さらに、再生医療等の目的で、細胞や組織を培養する場合、前記のとおり、「小スケール、多ロット並行培養」であるため、従来の抜き取り検査(侵襲性検査)

によって細胞等を測定するには同ロットの培養を多数行う必要性が生じる。また、侵襲性検査のような細胞を破壊して検査・測定を行うのでは、生産効率が大幅に低下する。さらにまた、患者の身体へ移植する目的がある以上、医薬品生産よりもより厳正な品質管理が要求されるため、測定用の器具や装置等が、培養中の細胞や組織、培養液等に直接の接触をできる限り避けることが重要である。そのため、再生医療を目的とした細胞の培養には、自動化された培養装置が有用であり、さらに、非侵襲性（すなわち、非接触性、非破壊性）を特徴とし、かつ、自動化された測定手段も有用であると期待されている。

- 10 非侵襲性の測定方法としては、たとえば、KEYENCE 社の「レーザーフォーカス変位計」や日本バイナリー社の「波長コンフォーカル方式」等が開発されてきている。しかしながら、これら非侵襲性の測定装置は、静置接着培養においては例がなく、また一連の培養操作とともに分析や測定作業が自動化されたものはない。

- この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みて、従来のような特殊な無菌施設を必要とせず、極めてクリーンな環境で培養でき、しかも高度な熟練性を有した限られた作業者に依存することなく、簡便、かつ効率的に、メンテナンスも容易に、培養経過に応じて培養環境の環境因子である圧迫力等も任意に、自動的に制御が可能として、長期間の培養を可能とする、新しい培養装置を提供することを課題としている。また、この出願の発明は、異なる細胞種や組織種間での相互混入防止をも可能とした新しい自動培養装置を提供することを課題としている。
- 15
- 20

さらにまた、この出願の発明は、生体由来の細胞や組織をその量および／または質を、非侵襲的、かつ、3次元的に分析・測定を行うことのできる測定装置を具備した新しい自動培養装置を提供することを課題としている。

25

#### 発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するための発明としてなされたものであって、閉鎖され、かつ、無菌状態の培養装置内で一連の培養操作を自動化した培養装置を提供する。またこの出願は、細胞や組織の量および／または質を非侵襲的、か



つ、3次元的な分析・測定操作を自動化した測定装置をも提供する。

すなわち、この出願の発明は、第1には、閉鎖され、かつ、無菌状態の内部空間を有する箱体の培養装置内で、培養容器において生体由来の細胞または組織を  
5 培養する自動培養装置であって、培養装置の箱体内に複数に区分けされた空間、開閉窓付きガスインキュベーター、培養液の供給装置と排出装置、培養状態の観察装置並びにこれら装置に培養容器を連続的もしくは断続的に移動させる移動装置が配置されているとともに、培養状態の観察装置からのデータ信号によって、前記の装置の少なくともいずれかのものの動作を電気信号により指示制御する  
10 指示制御装置が具備され、交叉汚染を防止することができることを特徴とする生体由来の細胞または組織の自動培養装置を提供する。

また、この出願の発明は、第2には、培養装置箱体内の一部または全部に滅菌ガスを導入する設定装置が具備されていることを特徴とする自動培養装置を、第3には、滅菌ガスが、オゾンガスであることを特徴とする自動培養装置を、第4  
15 には、培養装置箱体内の一部または全部を外部よりも陽圧とする環境条件の設定装置が具備されていることを特徴とする自動培養装置を提供する。

第5には、培養装置の箱体内が複数の空間に区分けされ、空間同士は閉鎖可能とされていることを特徴とする自動培養装置を提供し、第6には、培養装置の箱体内における複数の空間の区分けには、遮断板により区分けされ、この遮断板は  
20 培養容器の移動のための開閉自在な遮断板ドアを具備されていることを特徴とする自動培養装置を提供する。

さらに、この出願の発明は、第7には、細胞または組織の洗浄のための装置が配設され、培養容器のこの洗浄装置への移動と、それらの動作が指示制御装置により行われることを特徴とする自動培養装置を、第8には、薬剤添加のための装置が配設され、培養容器のこの薬剤添加装置への移動と、それらの動作が指示制御装置により行われることを特徴とする自動培養装置、第9には、培養容器の中の培養物が、培養容器の外部に対して遮断性を保持して培養容器内外へ移動することを特徴とする自動培養装置を提供する。

さらにまた、この出願の発明は、第10には、上記いずれかの自動培養装置であって、培養装置箱体内には培養容器から培養物を剥離もしくは回収のための装置を配設され、この装置への培養容器の移動が移動装置により可能とされていることを特徴とする自動培養装置を提供する。

第11には、剥離または回収のための装置が、振動装置または回転装置であることを特徴とする自動培養装置を、第12には、以上いずれかの自動培養装置であって、培養装置箱体内には培養環境条件を変更する圧迫装置が配設され、この装置への培養容器の移動が移動装置により可能とされていることを特徴とする自動培養装置を提供し、第13には、圧迫装置は磁石の着脱もしくは機械的押圧によるものであることを特徴とする自動培養装置を提供する。

また、この出願の発明は、第14には、培養液、洗浄液、もしくは薬剤が充填されている容器が再使用されないことを特徴とする自動培養装置を、第15には、培養液、洗浄液、もしくは薬剤の培養容器への供給が、滅菌済シリンジを介してなされることを特徴とする自動培養装置を、第16には、培養液、洗浄液、もしくは薬剤の培養容器への供給が、培養液、洗浄液もしくは薬剤の容器に接続された滅菌済チューブを介してなされることを特徴とする自動培養装置を提供する。

さらにまたこの出願の発明は、第17には、生体由来の細胞または組織を培養する培養容器を用いた静置接着培養において、生体由来の細胞または組織の量および/または質の分析測定を行うことを特徴とする非侵襲性測定装置を具備されていることを特徴とする自動培養装置を提供し、第18には、培養容器には、電気容量測定用電極が備えられ、かつ、2個以上の電気容量測定用電極の間に培養物が配置され、電気容量測定を行うことを特徴とする非侵襲性測定装置を具備した自動培養装置を、第19には、培養容器上方にXYスキャニング装置付き変位計を設置し、変位計による細胞の厚み測定に基づいて、生体由来の細胞または組織の分析測定を行うことを特徴とする非侵襲性測定装置を具備した自動培養装置を、そして第20には、培養容器上方にXYスキャニング装置付き蛍光測定装置を設置し、蛍光測定に基づいて、生体由来の細胞または組織の分析測定を行

うことを特徴とする非侵襲性測定装置を具備した自動培養装置をも提供する。

### 図面の簡単な説明

5 図1は、培養操作および培養環境の自動制御化を行った培養装置の実施形態を例示した概略図である。

図2は、図1における培養装置を遮断板により複数に区分けした培養装置の実施形態を例示した概略図である。

10 図3は、図1における培養装置に空気制御を施し、清浄、かつ、陽圧に維持させた培養装置の実施形態を例示した概略図である。

図4は、図1における培養装置に回収培養物貯槽、回収培養物移送装置および振動・回転装置を備えた、本発明の培養装置の実施形態を例示した概略図である。

図5は、振動・回転装置を拡大例示した模式図である。

15 図6は、図1における培養装置に圧迫装置を備えた培養装置の実施形態を例示した概略図である。

図7は、図6における圧迫装置で、磁石式圧迫装置の拡大模式図である。

図8は、図6における圧迫装置で、隔離式圧迫装置の拡大模式図である。

図9は、自動培養装置に設置される滅菌済シリンジを例示した模式図である

図10は、自動培養装置に設置される滅菌済チューブを例示した模式図である

20 図11は、電気容量測定による自動測定装置の実施形態を例示した模式図とその要部の拡大図である。

図12は、変位計測定による自動測定装置の実施形態を例示した模式図である。

図13は、蛍光測定による自動測定装置の実施形態を例示した模式図である。

なお、図中の符号は、次のものを示す。

- 25
- 1 培養装置
  - 2 培養容器
  - 3 ガスインキュベーター
  - 4 ガスボンベ

- 5 ガス供給装置
- 6 培養容器移動装置
- 7 新鮮培地貯槽
- 5 8 新鮮培地供給装置
- 9 使用済み培地貯槽
- 10 使用済み培地移送装置
- 101 回収培養物貯槽
- 102 回収培養物移送装置
- 10 11 顕微鏡観察ステージ
- 12 顕微鏡 CCD カメラ
- 13 観察画像データ移送装置
- 14 計測データ移送装置
- 15 制御信号伝達装置
- 15 16 制御コンピュータ
- 17 遮断板
- 18 遮断板ドア
- 19 インキュベート区分領域-a
- 20 操作および測定区分領域
- 20 21 インキュベート区分領域-b
- 22 滅菌ガス発生装置
- 23 滅菌ガス導入管
- 24 インキュベート区分領域-b 用滅菌ガス導入弁
- 25 操作および測定区分領域用滅菌ガス導入弁
- 25 26 インキュベート区分領域-a 用滅菌ガス導入弁
- 27 インキュベート区分領域-b 用滅菌ガス排出弁
- 28 操作および測定区分領域用滅菌ガス排出弁
- 29 インキュベート区分領域-a 用滅菌ガス排出弁

- 30 滅菌ガス排出管
- 31 滅菌ガス排出装置
- 32 除菌フィルター
- 5 33 返送風管
- 34 排出風管
- 35 外気取り込み管
- 36 返送風弁
- 37 排出風弁
- 10 38 外気取り込み弁
- 39 空気循環ポンプ
- 40 培養装置内圧力計
- 41 圧力信号伝送装置
- 42 圧力制御器
- 15 43 ポンプ運転制御信号
- 44 振動・回転装置
- 45 振動発生器
- 46 回転盤
- 47 培養容器の圧迫装置
- 20 48 圧迫装置
- 49 培養液
- 50 培養物
- 51 錘
- 52 電磁石
- 25 53 電流回路
- 54 スイッチ
- 55 伸縮性培養容器上蓋
- 56 圧迫物

- 57 作用軸
- 58 上下駆動装置
- 59 滅菌包装
- 5 60 ピストン部
- 61 シリンダー部
- 62 滅菌済み培養液
- 63 キャップ
- 64 培養液容器
- 10 65 チューブ
- 66 ポンプ
- 67 培養容器
- 68 細胞
- 69 電極
- 15 70 キャパシタンス計
- 71 XY スキャンニング装置
- 72 変位計
- 73 レーザー光
- 74 蛍光測定装置
- 20 75 励起光
- 76 蛍光

#### 発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は、上記のと通りの構成によって、閉鎖され、かつ、無菌状態  
25 の培養装置内で細胞または組織の培養の一連の培養操作および各種の培養環境  
制御を自動化した培養装置であることを特徴としており、さらには、培養装置内  
が複数の空間に区分けされていることを特徴としてもいる。

またこの出願の発明は、細胞や組織等の培養物に対して、非侵襲的に培養物の

特性や状態等を測定でき、かつ、これら一連の測定作業を自動化された測定装置であることを特徴としてもいる。

そこで以下にこの出願の発明について、その実施の形態について詳しく説明する。

まず、この出願の発明における「無菌状態」とは、クリーン度がクラス 1000 以下、望ましくは 100 以下としている。

また、この出願の発明の自動化培養装置が対象としている細胞または組織について説明すると、これらは、いずれも生体由来である。ここで、「生体」とは、植物、昆虫および動物であり、動物としては鳥類、爬虫類、両生類、魚類、哺乳類等が挙げられる。さらに、哺乳類としては、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ネズミ、ウマ等が例示できる。

培養する「細胞」は、いかなる由来の培養細胞でもよく、たとえば植物細胞、昆虫細胞、動物細胞があり、また異種由来の細胞同士あるいは細胞とコラーゲンゲル膜、繭糸、マイクロチップやナイロンメッシュ等の非細胞との融合細胞でもよい。もちろん、初代細胞や株化細胞でもよい。特に動物細胞であることを好ましい態様としている。さらに、動物細胞における初代細胞としては、ラット初代肝細胞、マウス初代骨髄細胞、ブタ初代肝細胞、ヒト初代臍帯血細胞、ヒト初代骨髄造血細胞、ヒト初代神経細胞等が例示される。また、株化細胞では、チャイニーズハムスター卵巣細胞由来の CHO 細胞、ヒト子宮ガン由来の HeLa 細胞、ヒト肝ガン由来の Huh7 細胞等が例示できる。また、これら細胞にプラスミド導入やウイルス感染等の遺伝子操作により得られた細胞もこの出願の発明に用いることができる。なお、「初代細胞」とは、一般に生体から細胞を採取して、50 回程度の限られた回数のみ増殖および分裂する細胞を指し、「株化細胞」は、生体から細胞を採取した後も、50 回以上の増殖および分裂する細胞のことを言う。

一方、「組織」とは、たとえば肝臓、心臓、腎臓、皮膚、骨、軟骨、骨髄等や、これら例示した組織から派生して形成された組織等が挙げられる。

細胞を培養する際、任意の種類の細胞または組織を得るため、分化を促進させ

る因子として分化誘導因子と呼ばれる薬剤を用いることもあるが、この種々の分化誘導因子の中から、最も適した分化誘導因子を用いるには、分化前の細胞の種類と分化後に得られる細胞の種類に依存する。また、単独あるいは複数の分化誘導因子の利用が可能である。これら分化誘導因子として、赤血球細胞に分化誘導させるエリスロポエチン、骨芽細胞への分化誘導を促進させる bone morphogenic protein (BMP)、肝実質細胞等への分化誘導を行う hepatocyte growth factor (HGF)、軟骨細胞へ分化を促進させる tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 等が例示できる。

この出願の発明における移植に用いる細胞または組織の由来および移植対象は、両者が同じ個体である場合の自家移植、両者が同じ生物種であるが、個体異なる場合の他家移植、または両者が異なる生物種である場合の異種移植等が例示できる。

そして、この出願の発明に用いる「培養容器」については、その素材はいかなるものでも良く、たとえばプラスチック製、ガラス製等がある。たとえば、プラスチックの素材としては、セルロース等の天然繊維、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリカーボネイト等の合成化合物およびこれらを組み合わせた混合物等がある。また、ポリ乳酸、ポリグリクロン酸等のような生体吸収性または生体分解高分子を用いてもよい。さらに、これらプラスチック素材をコラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン等の天然細胞外マトリックスやエチレンビニルアルコール共重合体等の人工化合物によりコーティングし親水化させて、培養容器として利用してもよい。ジエチルアミン、ジエチルアミノエチル等により修飾したものやプラズマ放電処理等を施し、表面に荷電基を導入したものも利用できる。

このような培養容器は、一般の研究室や実験室で 사용되는ことを主な目的として設計されて市販されているものでもよく、その内容積は一般的には 100  $\mu$ L ~ 500 mL であるが、大量培養用の培養容器を使用することもできる。また、培養容器内に細胞や組織を接着や固定をする担体を含ませた培養容器も利用できる。この場合の担体としては、不織布、織物、ゲル、発泡体、繭糸、針金、凍結乾燥された多孔体等が例示できる。さらにまた、培養容器内での物質の移動阻害、促



進、選択あるいは細胞の接着等を目的とした限外濾過膜、精密濾過膜、逆浸透膜等のような膜を内部に含ませた培養容器を使用することもできる。

また、培養容器の形状は、受け皿部と蓋部とからなるディッシュ型、液体等を出し入れする開口部が一つまたは複数備えたフラスコ型が例示できる。ディッシュ型の培養容器において、ディッシュ内が複数に区分けされたマルチウェル型やフラスコ型の培養器において、内面の全部または一部がガス透過性を有する多孔質膜からなるものもあり、これらも当然に使用することができる。

この出願の発明における、「培養液」および「培養操作」において説明すると、  
10 基本的には公知の組成成分および方法を用いることができる。もちろん、これに限定されることはない。「播種操作」についても、この出願の発明により自動化が可能である。たとえば、培養物が入った任意の容器やカートリッジ等を、培養装置内に用意された培養容器に培養物を播種するための装置である播種装置に設置し、該播種装置から該培養物を該培養容器に注入あるいは播種する等が考え  
15 られる。なお、「培養液」において、血清含有あるいは血清不含でもよく、また必要に応じ各種の増殖因子や分化誘導因子を加えて利用してもよい。増殖因子や分化誘導因子としては、表皮成長因子、血小板由来成長因子、トランスフェリン、インシュリン、血清アルブミン等が例示され、またコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞外マトリックス等も例示できる。これらは、脳下垂体、黄  
20 体、網膜、腎臓、胸腺、胎盤等の生体の臓器、組織、細胞等から抽出される場合、また遺伝子操作技術等の遺伝子工学的に製造された場合も含む。さらに、これら因子の修飾体であって増殖因子や分化誘導因子として作用するものも含み、たとえば上記の因子群のアミノ酸配列に別のアミノ酸を付加したもの、あるいは他のアミノ酸に置換したもの、またあるいはアミノ酸の一部が欠損したもの等が例として挙げられる。さらにまた、上記増殖因子において、由来によってタイプが異なる場合はヒト型でも他の動物型等でもよい。

「培養操作」としての「薬剤の添加」は、培養中の細胞または組織に特定の培地因子の添加を行う操作であり、通常は該培地因子の溶液を培養容器内の培養液

に注入することを意味している。該培地因子としては、血清、各種の増殖因子や分化誘導因子、グルコースやサッカロース等の糖類、アンピシリンや G418、テトラサイクリン等の抗生物質、ペクターウイルス等がある。

- 5      この出願の発明の培養装置では前記のとおり、一連の培養工程が自動化されており、そして培養環境の制御も自動化されている。ここで、「培養環境の制御」とは、培養における細胞の代謝、形態、機能等に影響する要因を操作する事である。コンタミネーション防止のための滅菌ガスの導入操作や培養中の細胞や組織の形態観察、細胞数の計測、活性測定等の分析操作も含まれる。培養中の細胞や組織に影響を及ぼす要因の操作は、具体的には培養液の温度、ガスの濃度、培養液内の静圧、培養液への栄養分供給速度、培養液中の老廃物濃度、培養液の pH 等が例示できる。そして、培養工程および培養環境の制御が自動化されることにより、異なる細胞間の交叉汚染等のコンタミネーションの防止、細胞や組織の増殖挙動にも対応、作業効率の向上等の効果が得られる。またこの出願の発明において、培養のために使用する「ガス」については、気体であればいかなるものでもよく、好ましくは炭酸ガスとしている。
- 10      15

なお、上記の「交叉汚染」とは、自動培養装置の箱体内で、複数に区分けされている空間において、ある区分け空間が、培養中のある細胞や該細胞に感染しているウイルス等や雑菌、化学物質、あるいは、培養中の培養物とは由来の異なるものの混入等によって汚染され、この汚染の影響が他の区分け空間にも伝播し、汚染されることを指す。

20

さらにこの出願の発明の自動培養装置では、培養装置箱体内を複数の空間に区分けされたものとしてもいる。ここで、「区分け」とは、培養装置箱体内の空間が複数の閉鎖された空間に区分け可能な状態をいう。隣接する区分けされた空間同士の間、たとえば遮断板が置かれて、遮断閉鎖されており、必要に応じて、開閉が可能となっている。なお、該遮断板の表面積に占める開口部の割合は、好ましくは 10%、さらに好ましくは 1%未満とすることが考慮される。これにより、多ロットの細胞または組織が並行に培養でき、さらに各ロットの細胞や組織の増

25

殖挙動にも対応でき、さらにまた区分けごとの滅菌や洗浄等のメンテナンスが容易となり、また遮断板によって他の区分けと遮断することによって、培養と前記メンテナンスが同時に行うこともできる。また、このような構成とすることにより、前記のとおり

5 5 の交叉汚染等のコンタミネーションを防止することもできる。

上記「遮断板」は、ステンレススチール等の金属類、プラスチック製あるいはガラス製等、培養装置箱体内を複数の空間に区分けすることのできるものであれば、その材質等は特に制限されるものではない。また、この「遮断板」には、培養容器の移動を円滑に行うために開閉自在な「遮断板ドア」が具備されていることが好ましい。さらにこの「遮断板ドア」の開閉動作の機構としては、開閉動作を電気信号により指示制御することによって自動開閉とすることもできる。

10 10 とが好ましい。さらにこの「遮断板ドア」の開閉動作の機構としては、開閉動作を電気信号により指示制御することによって自動開閉とすることもできる。

また、この自動開閉の動作機構とし、センサーを用いることも考慮することができる。たとえば、遮断板ドア近傍に培養容器の重さや動き等を感知するセンサーを配置して、培養容器が遮断板ドア近傍に移動してきた際、前記のセンサーが反応して遮断板ドアが自動開閉するように指示制御装置を設定する等が考えられる。

15 15 れる。

上記の「滅菌」操作には、たとえば、滅菌ガス、乾熱滅菌、 $\gamma$ 線滅菌、光滅菌等が挙げることができるが、培養装置の箱体内全体を確実に滅菌することができ、また滅菌時間の短縮等を考慮すると、滅菌ガスの導入による滅菌操作が好ましい。

20 20 もちろん、この滅菌ガスの導入操作も、指示制御装置の制御によって自動化することができ、培養装置箱体内の複数の空間に区分けされた一部または全部に任意で導入することもできる。また、この「滅菌ガス」は、たとえば、オゾンガス、エチレンオキサイド (EOG)、過酸化水素蒸気 (VHP) 等が挙げることができるが、細胞培養サイクルの効率化を考慮すると、滅菌時間が短くて済むオゾンガスであることが好ましい。滅菌時間は、特に制限されるものではないが、培養装置の箱体内全体の滅菌および培養サイクルの効率化を行うことが望ましいという観点から、30 分から 10 時間の範囲であることが好ましい。特に滅菌ガスをオゾンガスとした場合は、30 分から 1 時間の範囲で行うことが好ましい。

25 25 ることが好ましい。滅菌時間は、特に制限されるものではないが、培養装置の箱体内全体の滅菌および培養サイクルの効率化を行うことが望ましいという観点から、30 分から 10 時間の範囲であることが好ましい。特に滅菌ガスをオゾンガスとした場合は、30 分から 1 時間の範囲で行うことが好ましい。

さらにまた、この出願の発明の培養装置では、連続的または間欠的、または周期的に有限方向から圧迫しながら培養物を培養することを可能としている。これにより、培養環境因子の一つである圧迫力の自動制御を可能とする。圧迫の動力源としては、たとえば重力および磁石の磁力を利用することができる。なお、「磁石」は、磁力を有するものであればいかなるものでもよく、また固体でも液体でもよいが、固体が好ましい。磁力の大きさは一定でもよいし、電磁石のような任意に変化できるものでもよい。

この出願の発明の自動培養装置は、培養液、洗浄液、もしくは薬剤が充填されている容器が再使用されないことを特徴とし、また培養容器の中の培養物が、培養容器の外部に対して遮断性を保持して培養容器内外へ移動することを特徴としている。これらにおける「再使用されない」とは、培養液、洗浄液、もしくは薬剤を各容器から採取し、1度に1個以上の培養容器へ注入した後、これら培養液等が充填されていた各容器は、1度の培養作業において、再使用しないことを意味する。前記の培養液等が充填される各容器は、1度の培養作業が完了後、十分に洗浄および滅菌（オートクレーブ滅菌や UV 照射滅菌、 $\gamma$ 線滅菌等）をすることによって、次の培養作業に利用することができるが、他の培養容器への供給・混入の防止を確実にするためには、前記の各容器は、使い捨て（ディスポーザブル）であることがより好ましい。これによって、1個以上の培養容器に培養液等を供給した後、別の細胞種等が培養されている培養容器への供給（混入）を防止することとなる。なお、「1度の培養作業」とは、この出願の発明に具備されている制御コンピュータに入力・指示された一連の培養操作のことであり、この1度の操作時間は、培養の目的や環境等によって変動するため限定されないが、30分以内が好ましい。また、培養容器の数量においては、30個以内が好ましく、5個以内がさらに好ましい。「遮断性」とは、培養容器外の外気（空気や炭酸ガス等）やピペット、培養容器等の培養用器具との接触がないことを意味する。これによって、培養容器における密閉性をより高くすることができるため、培養物や培養液等の採取・注入の際の細菌等の混入の可能性をさらに減少させることがで

きる。そして、培養液、洗浄液、もしくは薬剤の培養容器への供給が滅菌済シリンジ、もしくは培養容器に接続された滅菌済チューブを介してなされることも特徴としている。

- 5 「滅菌済シリンジ」とは、各種の滅菌方法で滅菌されたシリンジ（注射筒）であり、このシリンジの形状としては、容器部とピストン部から構成されている。注射針の有無は問わず、またその材質はプラスチック製（ポリエチレン等）やガラス製でもよい。また、「滅菌済チューブ」とは、滅菌済シリンジと同様に各種の滅菌方法で、滅菌されたチューブ（管状）である。内径が、0.1mm 以上、かつ、  
10 20mm 以下が好ましい。前記の滅菌方法としては、たとえば、 $\gamma$ 線照射や滅菌ガス、オートクレーブ等が挙げられる。なお、これら滅菌済シリンジおよび滅菌済チューブは、培養容器間での相互混入を防止するため、ディスポーザブル（使い捨て）のものが好ましい。

- この出願の発明は、たとえば、培養容器上方に XY スキャニング装置付きの各種装置等を利用した、電気容量測定、変位計測定、もしくは、発光測定に基づいて、細胞または組織の量および／または質の分析測定を行うことを可能としている。しかも、この分析測定は、細胞や組織に対して非侵襲的に観察や分析測定を行うことを可能としている。

- 前記の「電気容量測定」としては、たとえば、2 個以上の電極の間に配置された培養容器（培養容器内には、培養中の細胞や組織を含む）に、周期的に電圧を加えた際に電気容量を起因として生じる電流周期の位相の差異を検出して、電気容量を計算する方法等がある。細胞に存在する細胞膜は、脂質 2 重膜となっており、絶縁体であるため、誘電率を有している。塩類を含む培養液中において、脂質 2 重膜で包まれた細胞に電圧を加えた場合、電気容量の大きさは、細胞膜の表面積に比例し、細胞膜の厚みに反比例することから、電気容量を測定することによって細胞の大きさや厚みが測定することができる。

「変位計測定」は、種々の原理のものが利用されるが、たとえば、被測定物（培養中の細胞や組織等）にレーザー光を照射し、反射してくる光の計測を利用した

レーザー変位計、可視光の共焦点を利用した波長コンフォーカル方式等を採用することができるが、これらに限定されるものではない。

また、「蛍光測定」は、たとえば、蛍光色素化合物、蛍光蛋白質、蛍光半導体  
5 （量子ドット）等、蛍光を発する物質（蛍光物質）を検出することによって、細胞や組織等の特性や形状等を測定する。蛍光物質としては、蛍光蛋白質が好ましく、特に内在性の蛍光蛋白質が好ましい。たとえば、細胞中に必ず存在する NADH 等が挙げられる。また、外来性の蛍光蛋白質としては、たとえば緑色蛍光蛋白質、赤色蛍光蛋白質、黄色蛍光蛋白質、青色蛍光蛋白質等が挙げられる。また、蛍光  
10 測定装置の励起光波長および励起光強度は、特に限定されるものではないが、励起光波長は、たとえば 300nm~600nm の範囲であることが好ましく、励起光強度は、細胞に対するダメージを考慮すると 100mW 以下が好ましい。蛍光測定方式も、フォトマルチプライヤ方式や CCD 方式等が例示でき、適宜に採択することができる。

15 これらの測定方法は、コンピュータ制御によって自動化され、また非侵襲的、かつ、3 次元的に細胞や組織を観察、分析の測定ができる。「非侵襲的」とは、培養物である細胞や組織に接触する必要がなく、またホモゲナイズ等のような破壊的な操作も必要のない、細胞や組織に対して極めて負荷の少ないことを意味し、  
「3 次元的」とは、平面的な情報だけでなく、細胞や組織の形成や形状等の立体的な情報、すなわち細胞の厚みや形状等のことを意味する。そして、細胞や組織  
20 の「量および／または質」とは、培養されている細胞や組織の、増殖度や成長度、あるいは、形状や各種の分泌物等のことである。

次に、添付した図面に沿って、この出願の発明の実施の形態についてさらに詳細に説明するが、この出願の発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、  
25 添付した図面では、ガスボンベ 4 の設置場所を培養装置 1 内として例示してあるが、培養装置 1 の外でもよい。また図面に例示していないが、細胞含有培養液から細胞と培養液とを分離するための装置として、培養装置 1 内に遠心分離装置等の設置も可能としている。

図 1 は、培養工程および培養環境制御が自動化された実施形態を例示している。この図 1 の例では、閉鎖された空間を有する箱体である培養装置 1 の内部には、ガスポンプ 4 およびガス供給装置 5 により、ガス濃度を一定に保つことが可能で、

5 培養物を有した培養容器 2 を静置可能とした箱体であるガスインキュベーター 3 があり、この中に静置された培養容器 2 の中で細胞または組織が培養される。また、このガスインキュベーター 3 には、培養容器 2 をガスインキュベーター 3 の内外を円滑に移動するための開閉自在な遮断板ドア 18 が具備されている。培養中の培養容器 2 は、培養容器移動装置 6 により、任意に順行または逆行に培養装置

10 1 の内部を移動する。この移動の過程で、新鮮培地貯槽 7 内の新鮮培地供給装置 8 による培養液吸引量の位置制御によって一定量吸引し、培養容器 2 へ培養液が注入されたり、培養容器 2 の培養液上清を使用済み培地移送装置 10 の下端を培養容器 2 内に入れ、貯槽内が陰圧に保たれた使用済み培地貯槽 9 に吸引排出されたりする事により、連続的あるいは断続的に培養液の供給および交換が可能と

15 されている。また、図に示していないが、緩衝液等の洗浄液が入った貯槽や、薬剤の入った貯槽も培養装置 1 内に設置することによって、洗浄や薬剤を培養液に加えることも可能とされる。もちろん、これら各々の工程を繰り返したり、あるいはスキップしたりすることも培養容器移動装置 6 と制御コンピュータ 16 により任意に制御可能とされている。また、培養容器 2 は顕微鏡ステージ 11 へも移動

20 可能で、たとえば顕微鏡 CCD カメラ 12 を使用して観察され、その観察画像データは観察画像データ移送装置 13 を介して制御コンピュータ 16 に送られる。また、温度、湿度、ガス濃度等の培養環境のデータが培養装置 1 から計測データ移送装置 14 を介し、同様に制御コンピュータ 16 に送られ、これらのデータを元に演算を行い、培養容器 2 の移動や遮断板ドア 18 の開閉、温度制御のためのデータ、

25 ガス濃度の制御等の制御信号が制御信号伝達装置 15 を通じて培養装置 1 に伝達される。このように、ほとんど全ての培養操作が培養装置 1 内で行われるため、培養中に培養装置外からの化学物質、埃や雑菌等の汚染発生の可能性は極めて低い。

図2では、図1に例示した培養装置1に遮断板17によって複数の空間に区分けされている実施の形態を例示している。培養装置1の内部は、遮断板17により3つの空間、すなわちインキュベート区分領域-a 19、操作および測定区分領域20、インキュベート区分領域-b 21、に仕切られている。培養容器2は、遮断板17にある開閉自在な遮断板ドア18を通じて、各空間に任意に順行または逆行で移動することが可能で、この3つの空間を往来可能とされている。また、遮断板ドア18を閉じることによって3つの空間は互いに封鎖され、独立した空間となる。滅菌ガス発生装置22より滅菌ガスが、滅菌ガス導入管23および滅菌ガス導入弁24、25および26を介して、任意の空間に注入されて、滅菌が可能とされている。さらに、この図中の例示したインキュベート区分領域-a 19内に滅菌ガスを注入する際、任意にガスインキュベーター3の遮断板ドア18の開閉を行うことによって、ガスインキュベーター3の内部にも滅菌ガスを注入することが可能となっている。滅菌中の空間に注入された滅菌ガスは他の空間には全く混入しないため、影響を及ぼさない。滅菌終了後、滅菌ガスは、滅菌中であった空間の滅菌ガス排出弁27、28および29および滅菌ガス排出管30を介して、滅菌ガス排出装置31に排出され、該空間内には滅菌ガスは残存しない。これにより、長期間に及ぶ培養期間中でも、随時培養装置内を滅菌でき、極めてクリーンな環境を維持できる。これら遮断板ドア18の開閉および滅菌ガス操作も制御コンピュータ16により任意に制御でき、しかも自動開閉式とすることもできる。なお、遮断板17の数を増減する事によって、区分けされる空間数も増減でき、その結果、より多くの培養操作工程が同時に行う事ができ、また多くのロットの培養細胞の培養ができる。

図3では、圧力制御の機能を備えた培養装置1の実施形態を例示している。この例では、培養装置1の内部の気体は、排出風管34および排出弁37を介して空気循環ポンプ39に送られる。ここで外気取り込み管35および外気取り込み弁38を介し、培養装置1の外の気体も取り入れ、両者を合わせた気体が返送風管33および返送風弁36を介し、さらに除菌フィルター32を通過し培養装置1の内部



に戻される。この気体の循環により、培養装置 1 内は、清浄な空気が維持される。

培養装置 1 内部の静圧は、培養容器内圧力計 40 により測定され、そのデータは圧力信号伝送装置 41 を介し圧力制御器 42 に送られる。そして、培養装置 1 内を

- 5 外部より陽圧に保つために、圧力制御器 42 は、排出風速度、外気取り込み速度、返送風速度等の設定値を演算、計算し、その結果をポンプ運転制御信号 43 として空気循環ポンプ 39 に伝達する。その結果、培養装置 1 の内部の空気は、常時清浄に維持され、また培養装置外より陽圧に保持される。このため、培養装置の外部からの汚染物質の混入も極めて効果的に抑えられる。またこの図 3 では、圧
- 10 力制御器 42 で陽圧の制御を行っている例示をしたが、制御コンピュータ 16 をさらに連結設置させた場合、制御コンピュータ 16 による圧力制御器 42 の制御が可能となり、この制御を介して、陽圧の制御も可能となる。

- 図 4 では、培養装置 1 に回収培養物貯槽 101、回収培養物移送装置 102 および振動・回転装置 44 を備えた実施形態を例示している。なお、図 4 では、顕微鏡
- 15 CCD カメラ 12、観測画像データ伝送装置 13 および制御コンピュータ 16 の図による例示は省略しているが、顕微鏡 CCD カメラ 12 および観測画像データ伝送装置 13 としての機能動作、また制御コンピュータ 16 による、培養装置 1 内の環境等の各制御機構は働いている。培養容器 2 中の細胞は、培地置換、洗浄、酵素処理により細胞の脱着および剥離等といった一連の培養操作により、培養容器内部の
- 20 細胞接着面から脱着する傾向がある。しかしながら、全ての細胞が脱着には至らなく、また細胞同士も凝集している場合が多々ある。この状態にある培養容器 2 を培養容器移動装置 6 により、振動・回転装置 44 に移動させて、任意に振動および回転を与えることで、ほとんどの細胞が脱着および剥離し、また凝集した細胞も解離し、細胞が均一に分散した細胞懸濁液を得ることができる。この細胞懸
- 25 濁液を含んだ培養容器 2 を培養容器移動装置 6 により回収培養物貯槽 101 まで移動させ、回収培養物移送装置 102 を介して、回収培養物貯槽 101 に回収される。拡大概略図として図 5 に例示したように、振動・回転装置 44 では、振動発生器 45 により培養容器 2 に振動が伝えられ、また回転盤 46 により培養容器 2 に回転

を与えることができる。

図6は、培養装置1に培養容器圧迫装置47を備えた例を示したものである。

なお、顕微鏡CCDカメラ12、観測データ伝送装置13および制御コンピュータ16

- 5 の図による例示は省略しているが、設置および使用することはもちろん可能である。この例では、培養装置1内のガスインキュベーター3の中で、培養中の培養容器2の培養物に培養容器圧迫装置47により任意の周期で、また任意の強度の圧迫力を加えることができるようにしている。このような圧迫力が加えられることによって、圧迫力という刺激によって、インターロイキン、サイトカイン、TNF- $\alpha$ やキナーゼ等、種々の生体因子の活性化、抑制や分泌等の制御機構が働き、またこの刺激信号が次々と分子レベルで伝達（カスケード）され、その結果細胞や組織の成長に対する作用効果が得られ、細胞や組織の培養環境を制御できる。さらにまた、三次元培養の場合、圧迫により培養物が伸縮し、それにより培養物の外と中との間で強制的に培養液の流れが起こり、物質の移動が促進することも期待できる。培養容器の圧迫装置47としては、各種の方式、機構によるものとす
- 15 ることができ、たとえば以下の図7および8が例示することができる。

そして図7では、磁石式の場合の培養容器圧迫装置48の構造概略図を例示している。圧迫装置48内の培養容器2の上蓋内側に錘51が設置され、また培養容器2の上蓋の上には電磁石52が設置され、電流回路53およびスイッチ54により、その磁力のオンオフを制御コンピュータ16により自動制御するようにしている。図7-(A)のように、電流回路がオンの状態であれば、電磁石の作用により錘51は培養容器2内で上方に設置された電磁石52に引き寄せられ、培養容器2内部の培養液49中にある培養物50から隔てられる。また図7-(B)のように、電源がオフの状態では、電磁石の作用は消失し、錘51が培養物50の上に落下して、

25 培養物50に圧迫力が加えられる。

また図8は、隔離式の場合の培養容器圧迫装置48の構造概略図例示している。圧迫装置48内にある培養容器2の伸縮性培養容器上蓋55は、伸縮性のあるやわらかい素材で作製されている。一方、培養容器2の外側上部では上下駆動装置58

と作用軸 57 との作用により圧迫物 56 が、制御コンピュータ 16 により任意、かつ、自動的に上下運動させることが可能とされている。図 8-(B) に示したように、この圧迫物 56 が下降した時、伸縮性培養容器上蓋 55 を押し下げ、培養容器 2 内部の培養液 49 中の培養物 50 を圧迫する。また、図 8-(A) にあるように、圧迫物 56 が上方に移動した時は、圧迫物 56 は引き上げられ、伸縮性培養容器上蓋 55 が通常の上蓋の形に戻り、培養物 50 は圧迫されない。つまり、圧迫物 56 の上下運動により、培養物 50 に対する圧迫作用を制御する。

図 9 は、自動培養装置に設置される滅菌済シリンジを例示した模式図である。

10 この滅菌済シリンジは、ピストン部 60 とシリンダー部 61 とからなり、シリンダー内部に滅菌済み培養液 62 が入れられ、キャップ 63 により密閉され、さらに包装 59 によって無菌性が保持されている。新鮮培地貯槽 7 の代わりに、複数（必要量に応じて）の滅菌済シリンジを包装されたまま自動培養装置 1 内に設置して、ロボットアーム（図示せず）等によって、滅菌済シリンジを保持し、また所望位置へ移動し、ピストン部 60 に適度な圧力をかけて、滅菌済み培養液 62 を培養容器へ注入する。

図 10 は、自動培養装置に設置される滅菌済チューブを例示した模式図である。

この滅菌済チューブは、培養液容器 64 とチューブ 65 とからなり、培養液容器 64 内に培養液 62 が入れられており、チューブ 65 の先端にはキャップ 63 により密閉され、さらに包装 59 によって無菌性が保持されている。前記の滅菌済みシリンダーと同様に、新鮮培地貯槽 7 の代わりに、複数（必要量に応じて）の滅菌済チューブを包装されたまま自動培養装置 1 内に設置して、ロボットアーム（図示せず）等によって、滅菌済チューブを保持し、また所望位置へ移動し、後付けされたポンプ 66 に適度な圧力をかけて、滅菌済み培養液 62 を培養容器へ注入する。

25 なお、前記の滅菌済みシリンジおよび滅菌済みチューブの包装 59 およびキャップ 63 は、自動培養装置 1 内で使用直前にロボットアーム等によって外される。また、培養液 62 の容量は、培養容器 1 個分から数個分程度であり、使用後は廃棄されるため、異なる細胞種の培養容器間での相互混入を防止することができる。

図 1 1 は、電気容量測定による自動測定装置の実施形態を例示した模式図と、その要部の拡大図である。培養容器 67 内には、細胞 68 が培養されており、培養容器 67 の底面部には、2 個の電極 69 が配設されている。この電極 69 は、キャパシタンス計 70 と連結され、制御コンピュータ 16 へと連結されている。このキャパシタンス計 70 により得られるキャパシタンス値は、培養容器 67 に接着している細胞 68 の形状や状態によって変化し、その測定情報は制御コンピュータ 16 に伝送され、分析され、細胞量や分化状態等、細胞の量および／または質が測定される。

10 図 1 2 は、変位計測定による自動測定装置の実施形態を例示した模式図である。図 1 2 に例示したように、たとえば光源を利用したものが利用できる。培養容器 67 の上方には、XY スキャニング装置 71 に取り付けられた変位計 72 があり、変位計 72 からレーザー光 73 が細胞に照射して、変位計 72 にその光が反射する。この細胞上部と細胞下部からの反射の差異を測定することで、細胞の厚みを測定  
15 することができる。もちろん、変位計は光源を利用したものに限定されるものではない。

図 1 3 は、蛍光測定による自動測定装置の実施形態を例示した模式図である。この図 1 3 では、培養容器 67 内には、細胞 68 が接着培養されており、培養容器 67 の上方には、XY スキャニング装置 71 に取り付けられた蛍光測定装置 74 があ  
20 り、この蛍光測定装置 74 から励起光 75 が細胞 68 に照射される。そして、細胞 68 から蛍光 76 が発生し、この蛍光 76 を蛍光測定装置 74 で検出し、細胞 68 の分化状態等を分析・測定することができる。

上記いずれの測定装置においても、自動培養装置 1 内に設置され、また、この測定装置から得られた細胞や組織の各種の情報（形態や、増殖速度、分泌物の観  
25 測等）は、制御コンピュータ 16 に伝送、分析され、そしてさらに、この制御コンピュータ 16 によって自動制御される。

### 産業上の利用可能性

この出願の発明によって、培養工程のほとんどが自動化され、特殊な無菌施設を必要とせず、極めてクリーンな無菌的環境で、しかも培養環境の環境因子も任

5 意、かつ、培養経過に応じて自動制御が可能な培養装置が提供される。

また、この出願の発明の培養装置内は、複数の培養室に区分けされているため、ロットごとに異なる増殖挙動にも対応でき、また小スケールで多ロット並行の培養も可能となり、さらにまた個別に洗浄および殺菌等のメンテナンスも行うこと

10 が可能な培養装置が提供される。

さらにまた、この出願の発明は、培養される細胞や組織に対して非侵襲的、かつ、3次元的に観察や測定、分析等の一連の作業が自動化された測定装置を具備された自動培養装置が提供される。

## 請求の範囲

1. 閉鎖され、かつ、無菌状態の内部空間を有する箱体の培養装置内で、培養容器において生体由来の細胞または組織を培養する自動培養装置であって、培養装置の箱体内に複数に区分けされた空間、開閉窓付きガスインキュベーター、培養液の供給装置と排出装置、培養状態の観察装置並びにこれら装置に培養容器を連続的もしくは断続的に移動させる移動装置が配置されているとともに、培養状態の観察装置からのデータ信号によって、前記の装置の少なくともいずれかのものの動作を電気信号により指示制御する指示制御装置が具備され、交叉汚染を防止することができることを特徴とする生体由来の細胞または組織の自動培養装置。
2. 培養装置箱体内の一部または全部に滅菌ガスを導入する設定装置が具備されていることを特徴とする請求項1の自動培養装置。
3. 滅菌ガスが、オゾンガスであることを特徴とする請求項2の自動培養装置。
4. 培養装置箱体内の一部または全部を外部よりも陽圧とする環境条件の設定装置が具備されていることを特徴とする請求項1ないし3いずれかの自動培養装置。
5. 培養装置の箱体内が複数の空間に区分けされ、空間同士は閉鎖可能とされていることを特徴とする請求項1ないし4いずれかの自動培養装置。
6. 培養装置の箱体内における複数の空間の区分けには、遮断板により区分けされ、この遮断板は培養容器の移動のための開閉自在な遮断板ドアを具備されていることを特徴とする請求項5の自動培養装置。
7. 細胞または組織の洗浄のための装置が配設され、培養容器のこの洗浄装置への移動と、それらの動作が指示制御装置により行われることを特徴とする請求項1ないし6いずれかの自動培養装置。
8. 薬剤添加のための装置が配設され、培養容器のこの薬剤添加装置への移動と、それらの動作が指示制御装置により行われることを特徴とする請求項1ないし7いずれかの自動培養装置。

9. 培養容器の中の培養物が、培養容器の外部に対して遮断性を保持して培養容器内外へ移動することを特徴とする請求項 1 ないし 8 いずれかの自動培養装置。

5 10. 請求項 1 ないし 9 いずれかの自動培養装置であって、培養装置箱体内には培養容器から培養物を剥離もしくは回収のための装置を配設され、この装置への培養容器の移動が移動装置により可能とされていることを特徴とする自動培養装置。

11. 剥離または回収のための装置が、振動装置または回転装置であることを  
10 特徴とする請求項 10 の自動培養装置。

12. 請求項 1 ないし 11 いずれかの自動培養装置であって、培養装置箱体内には培養環境条件を変更する圧迫装置が配設され、この装置への培養容器の移動が移動装置により可能とされていることを特徴とする自動培養装置。

13. 圧迫装置は磁石の着脱もしくは機械的押圧によるものであることを特徴  
15 とする請求項 12 の自動培養装置。

14. 培養液、洗浄液、もしくは薬剤が充填されている容器が再使用されないことを特徴とする請求項 1 ないし 13 いずれかの自動培養装置。

15. 培養液、洗浄液、もしくは薬剤の培養容器への供給が、滅菌済シリンジを介してなされることを特徴とする請求項 1 ないし 14 いずれかの自動培養装  
20 置。

16. 培養液、洗浄液、もしくは薬剤の培養容器への供給が、培養液、洗浄液もしくは薬剤の容器に接続された滅菌済チューブを介してなされることを特徴とする請求項 1 ないし 14 いずれかの自動培養装置。

17. 生体由来の細胞または組織を培養する培養容器を用いた静置接着培養に  
25 おいて、生体由来の細胞または組織の量および／または質の分析測定を行うことを特徴とする非侵襲性測定装置を具備されていることを特徴とする自動培養装置。

18. 培養容器には、電気容量測定用電極が備えられ、かつ、2 個以上の電気容

量測定用電極の間に培養物が配置され、電気容量測定を行うことを特徴とする非侵襲性測定装置を具備した請求項 17 の自動培養装置。

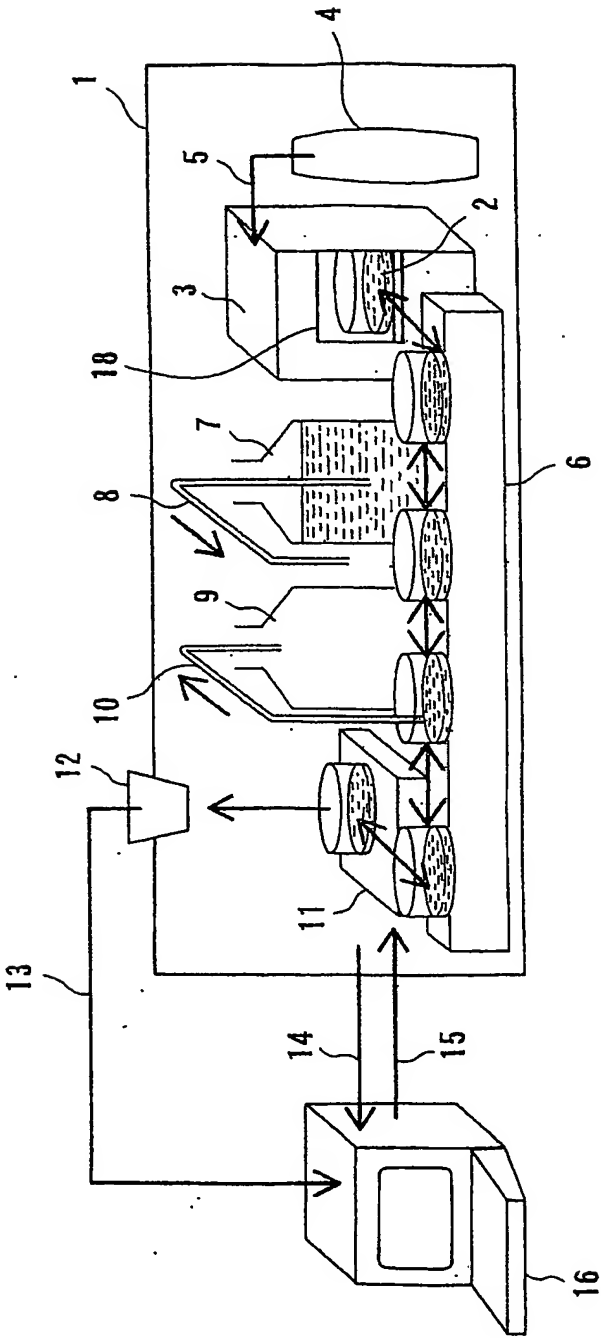
19. 培養容器上方に XY スキャニング装置付き変位計を設置し、変位計による  
5 細胞の厚み測定に基づいて、生体由来の細胞または組織の分析測定を行うことを特徴とする非侵襲性測定装置を具備した請求項 17 の自動培養装置。

20. 培養容器上方に XY スキャニング装置付き蛍光測定装置を設置し、蛍光測定に基づいて、生体由来の細胞または組織の分析測定を行うことを特徴とする非侵襲性測定装置を具備した請求項 17 の自動培養装置。



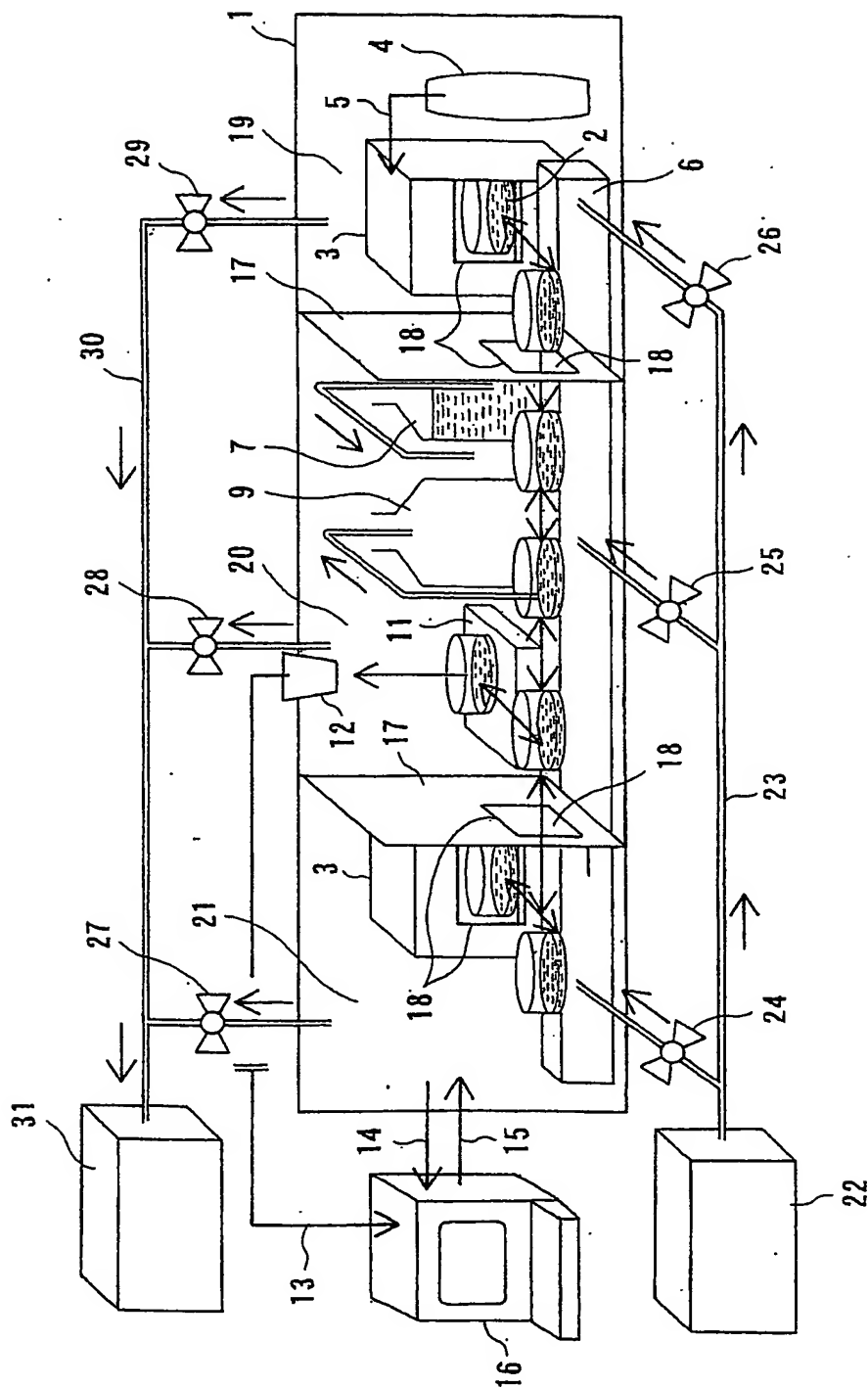
1 / 1 3

図 1



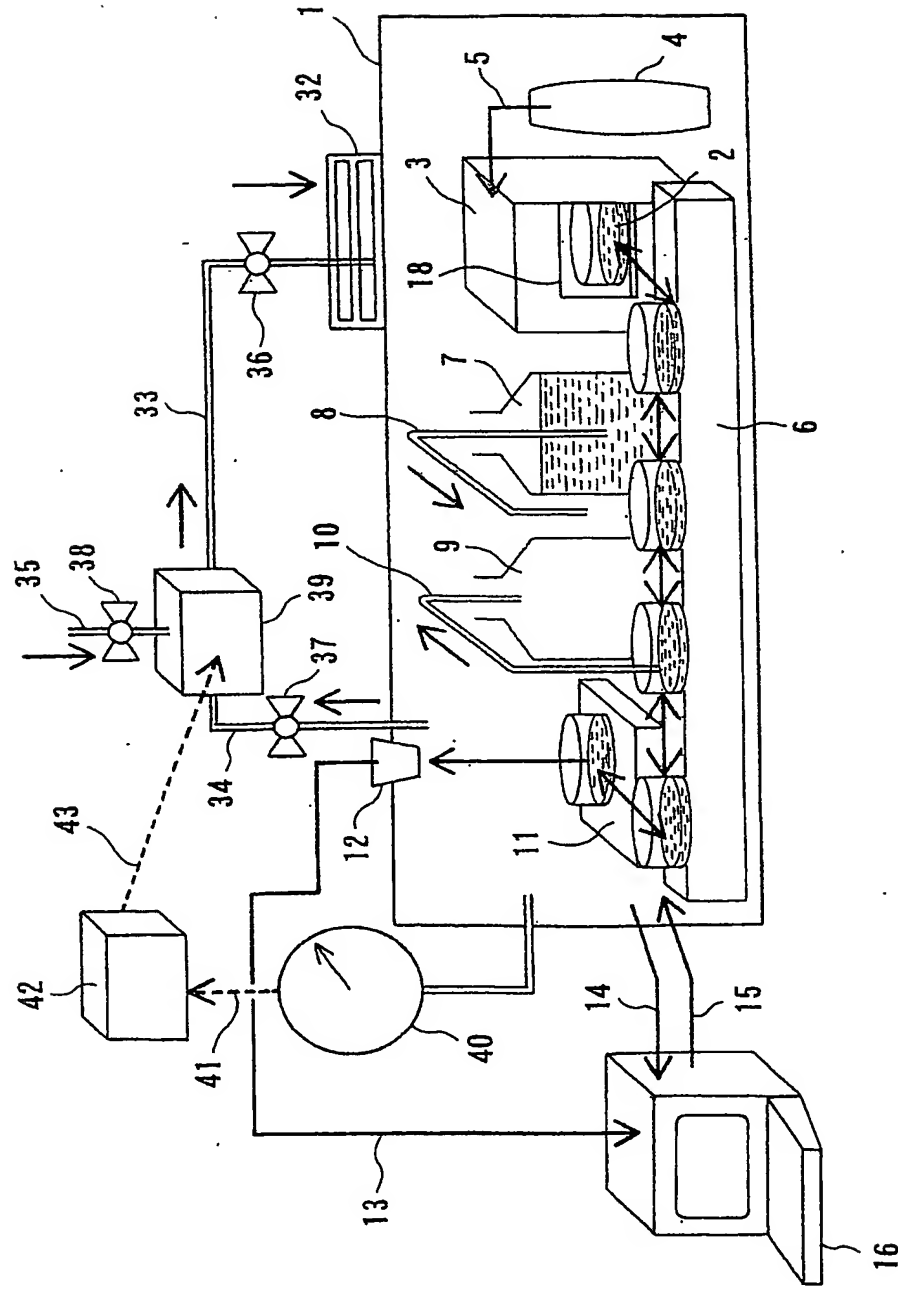
2/13

図 2



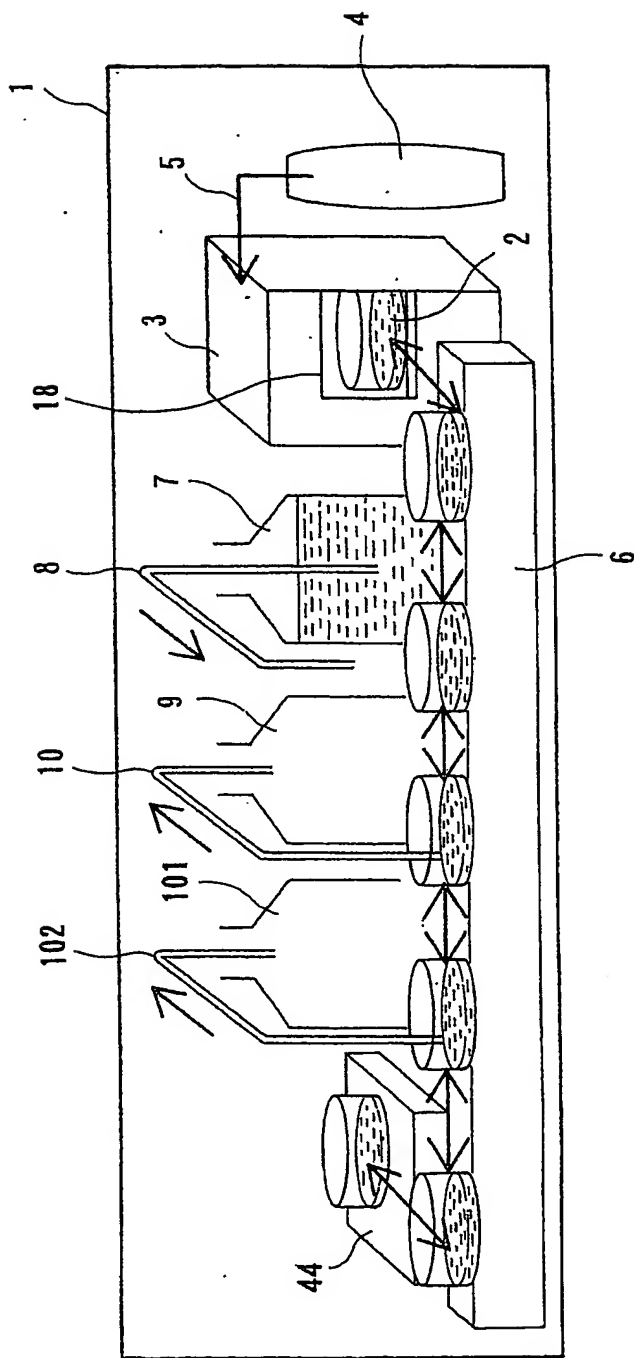
3 / 1 3

図 3



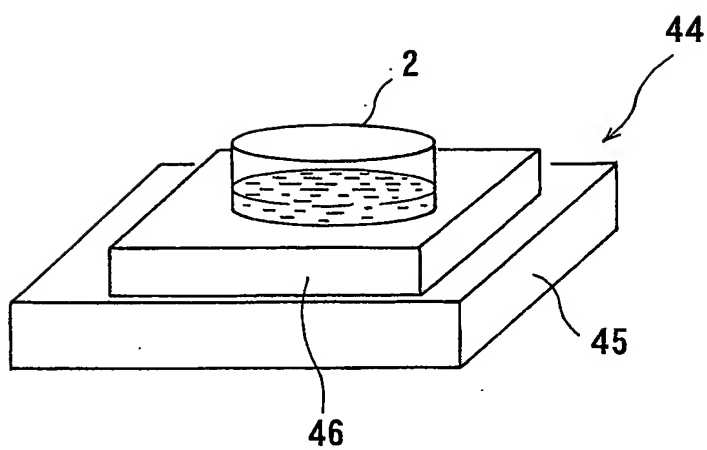
4/13

図4



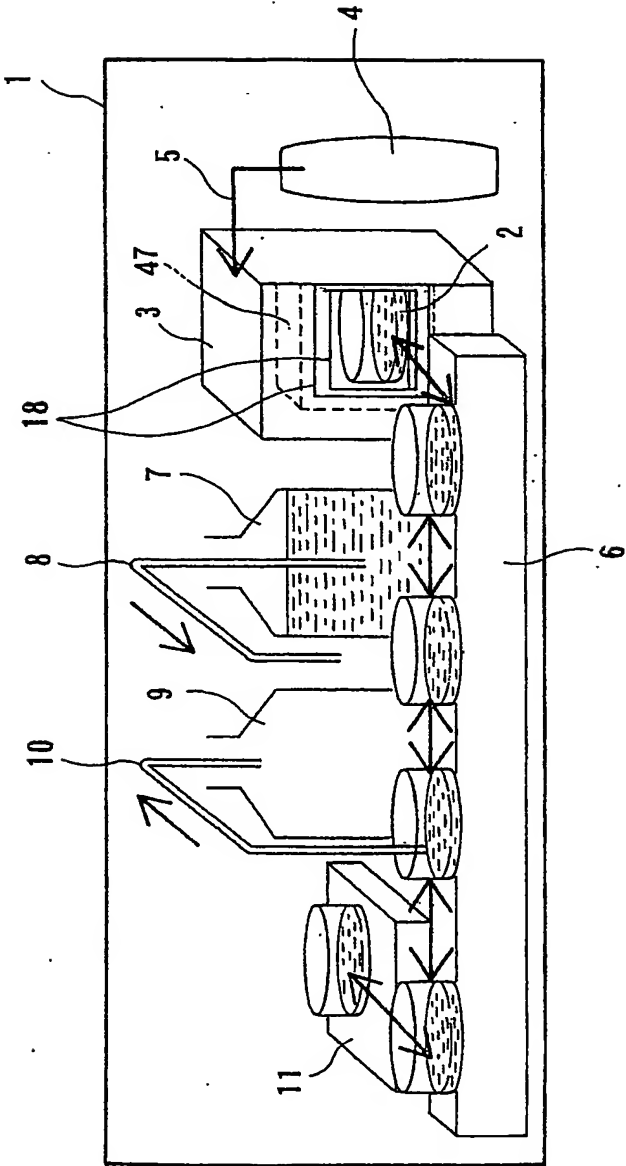
5/13

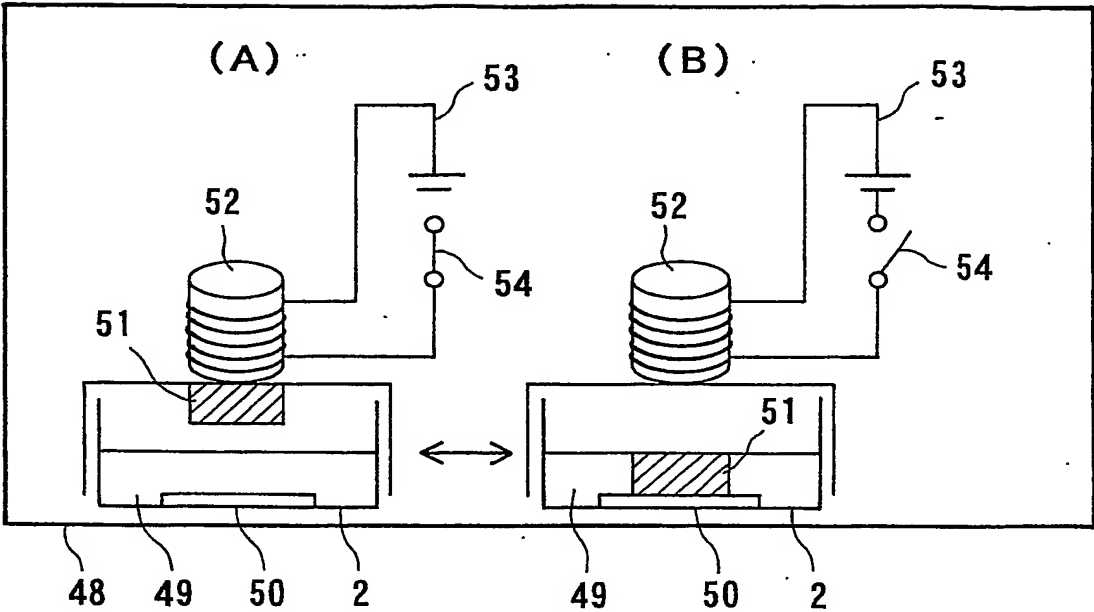
図 5



6/13

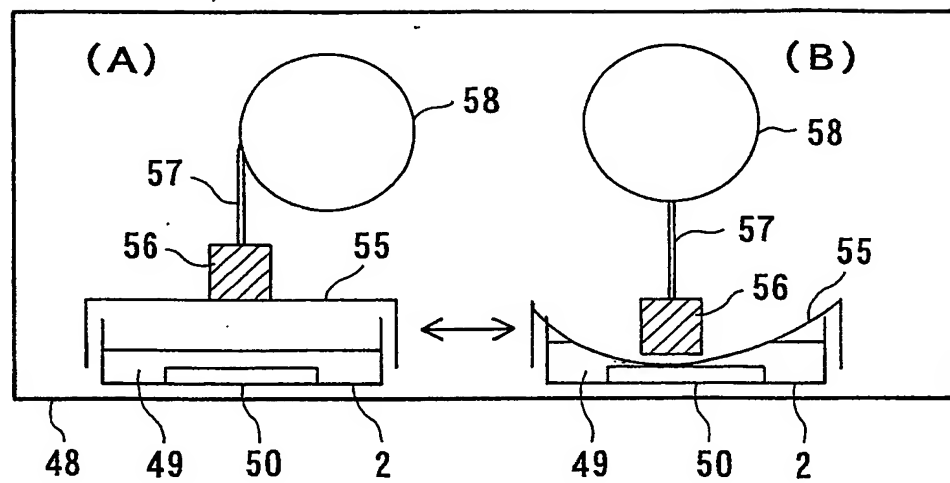
図 6





8/13

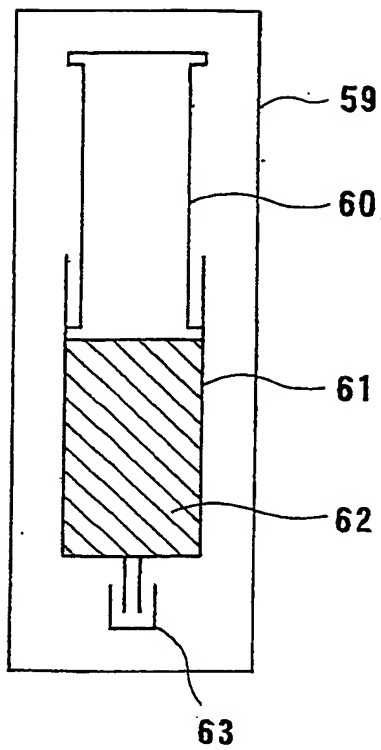
図 8





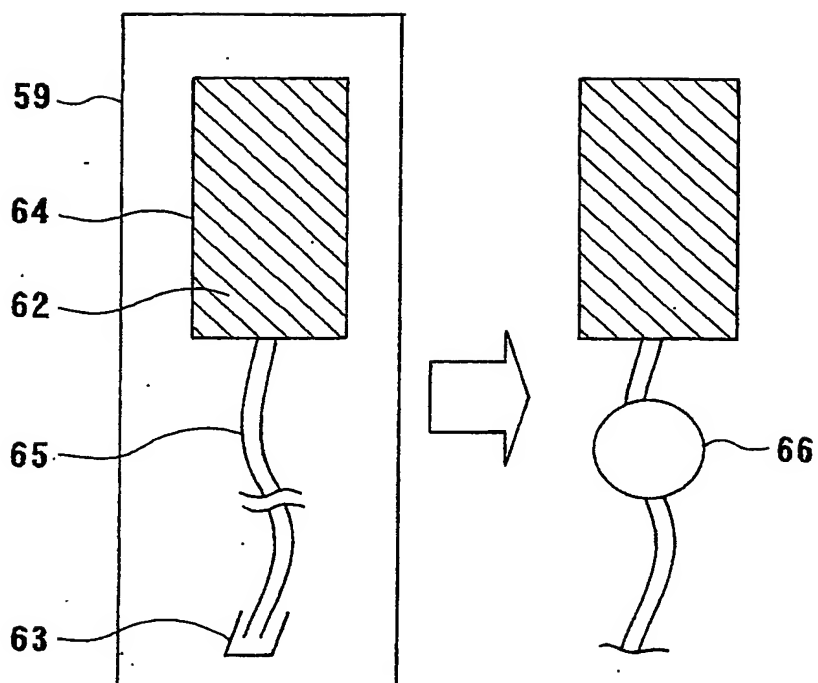
9/13

図 9



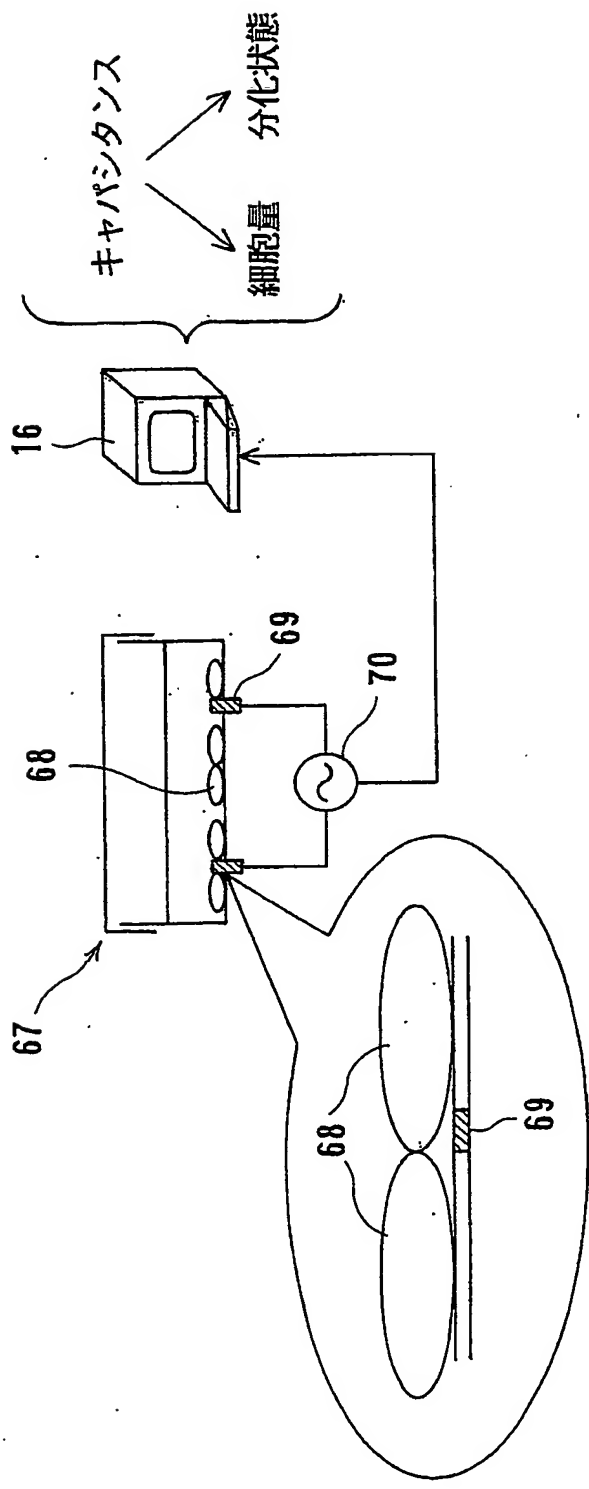
10/13

図 10



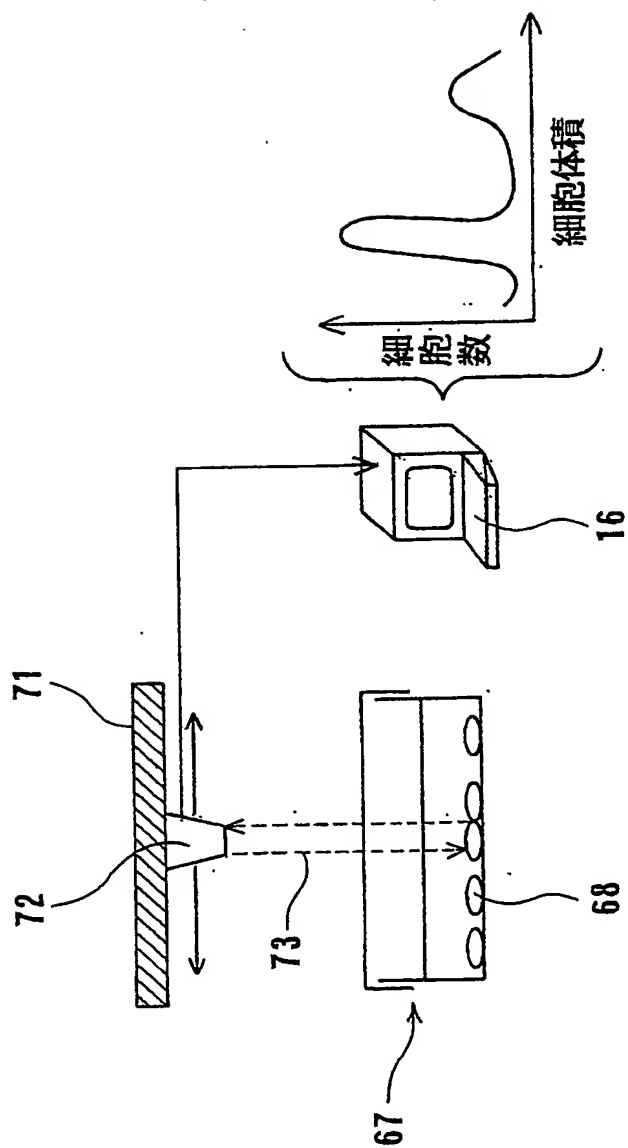
11/13

図11



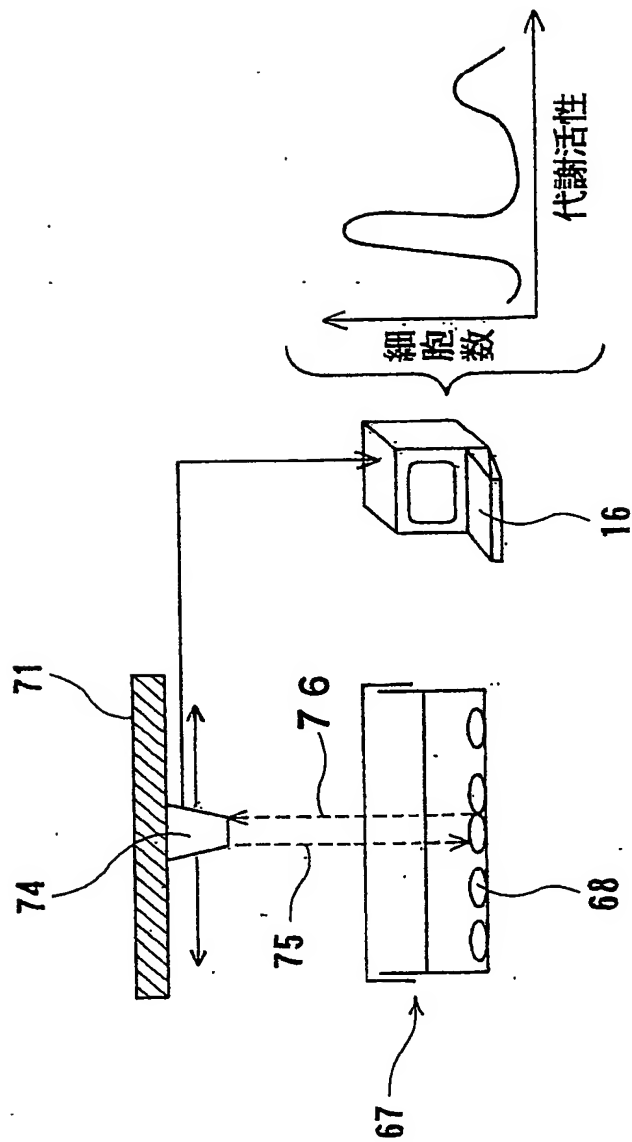
1 2 / 1 3

図 1 2



1 3 / 1 3

図 1 3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09742

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/00-3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-290059 A (Masashi FUNAYAMA),	17, 19, 20
Y	26 October, 1999 (26.10.99),	18
A	(Family: none)	1-16
Y	WO 99/34202 A1 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.),	18
	08 July, 1999 (08.07.99),	
	& EP 1040345 A1 & JP 11-187865 A	
A	JP 7-256141 A (Ebara Research Co., Ltd.),	1-16
	09 October, 1995 (09.10.95),	
	(Family: none)	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
05 November, 2003 (05.11.03)

Date of mailing of the international search report  
18 November, 2003 (18.11.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09742

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09742

### Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

According to the statement in the description of the present case, it is recognized that the inventions as set forth in claims 1 to 16 relate to an automatic culture apparatus wherein environmental factors of culture conditions such as pressure can be arbitrarily and automatically controlled appropriately for the progress of the culture by convenient and efficient procedures with easy maintenance operations in an extremely clean environment while needing neither any special aseptic design nor any skilled and limited persons, thereby enabling prolonged culture.

On the other hand, it is recognized that the inventions as set forth in claims 17 to 20 relate to a culture apparatus having a measurement unit by which the quantity and/or quality of cells or a tissue with a biological origin can be noninvasively and three-dimensionally analyzed and measured.

Therefore, it can be said that the inventions as set forth in claims 1 to 16 and the inventions as set forth in claims 17 to 20 are common to each other in the point of being a culture apparatus.

However, culture apparatuses had been well known before the priority date of the present case. Therefore, the inventions as set forth in claims 1 to 16 and the inventions as set forth in claims 17 to 20 cannot be considered as having any technical feature in common making a contribution over the prior art. Also, these groups of inventions are not considered as being a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Such being the case, it is concluded that the present case has 2 groups of inventions, i.e., the inventions as set forth in claims 1 to 16 and the inventions as set forth in claims 17 to 20.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12M3/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12M1/00-3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	JP 11-290059 A (船山 政志) 1999. 10. 26 (ファミリーなし)	17, 19, 20 18 1-16
Y	WO 99/34202 A1 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) 1999. 07. 08 & EP 1040345 A1 & JP 11-187865 A	18
A	JP 7-256141 A (株式会社荏原総合研究所) 1995. 10. 09 (ファミリーなし)	1-16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 11. 03

国際調査報告の発送日

18.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4N

3228

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ) 参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

本願明細書の記載を参酌すると、請求の範囲1-16に記載された発明は、特殊な無菌施設を必要とせず、極めてクリーンな環境で培養でき、しかも高度な熟練性を有した限られた作業者に依存することなく、簡便、かつ効率的に、メンテナンスも容易に、培養経過に応じて培養環境の環境因子である圧迫力等も任意に、自動的に制御が可能として、長時間の培養を可能とする自動培養装置であると認められる。

一方、請求の範囲17-20に記載された発明は、生体由来の細胞や組織をその量および/または質を、非侵襲的、かつ、3次元的に分析・測定を行うことのできる測定装置を具備した培養装置であると認められる。

したがって、請求項1-16に記載された発明と17-20に記載された発明は、ともに培養装置である点において共通しているといえる。

しかしながら、培養装置は本願優先日前から既に周知であるから、請求項1-16に記載された発明と17-20に記載された発明は、先行技術に対して貢献する技術的特徴を共有するものとは認められず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

よって、この出願には、請求の範囲1-16に記載された発明と、請求の範囲17-20に記載された発明の、計2の発明が包含されているといえる。